اثر کاربرد متانول بر برخی ویژگی‌های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) تحت تنش خشکی

سعید رضا حسین زاده [۱]، اعظم سلیمی [۲]، علی گنجعلی [۳] و راحله احمدپور [٤،*]

۱- عضو هیئت‌علمی بورسیه دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان

۲- استادیار دانشکده علوم، دانشگاه خوارزمی تهران

۳- دانشیار دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد

٤- عضو هیئت‌علمی دانشگاه صنعتی خاتم‌الانبیاء بهبهان

تاریخ دریافت:۱۳۹۳/۱۱/۱۵

تاریخ پذیرش:: ۱۳۹٤/۵/۲۵

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی اثر محلول‌پاشی متانول بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در گیاه نخود تحت تنش خشکی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در شهریور سال ۹۰ در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد به اجرا درآمد. عامل محلول‌پاشی متانول با ۵ سطح، شاهد (بدون محلول‌پاشی)، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درصد حجمی بود که به هر کدام از سطوح ۲ گرم در لیتر گلیسین اضافه شد. محلول‌پاشی ۳ بار طی فصل رشد گیاه و با فواصل ۱۰ روز صورت گرفت. محلول‌پاشی گیاهچه‌ها تا زمان جاری شدن قطره‌های محلول روی برگ ادامه یافت. عامل خشکی نیز شامل تنش خشکی (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) و بدون تنش خشکی (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) اعمال شد. نتایج نشان داد بین سطوح مختلف متانول اختلاف معنی‌داری از نظر پروتئین محلول برگی، پرولین، کربوهیدرات محلول برگی، پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز وجود داشت ($P \leq 0.01$). مقایسه میانگین صفات مورد بررسی نشان داد که سطح ۳۰ درصد حجمی متانول بیشترین تأثیر را بر صفات مورد بررسی دارد. اثرات متقابل تنش خشکی و متانول تأثیر معنی‌داری بر میزان پروتئین محلول برگی، کربوهیدرات محلول برگی، پراکسید هیدروژن، مالون دی آلدئید، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز نداشت اما بر محتوی پرولین معنی‌دار است ($P \leq 0.05$).

واژگان کلیدی: متانول، ویژگی‌های بیوشیمیایی، تنش خشکی، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

* نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیکی: **ahmadpour@bkatu.ac.ir**

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

مقدمه

تنش خشکی یکی از مشکلات عمده تولید گیاهان زراعی در ایران و جهان به شمار می رود و تهدید جدی برای تولید موفقیت‌آمیز محصولات زراعی در سراسر جهان است (Ober, 2001). در حدود یک سوم از زمین‌های قابل‌کشت دنیا به‌طور قابل‌توجهی با کمبود آب مواجه هستند (Clover *et al*.,1998). با اینکه نخود گیاهی نسبتاً مقاوم به خشکی است اما جهت حصول عملکرد بالا اتخاذ راهکارهایی که بتواند اثر تنش خشکی را کاهش دهد، مورد توجه محققان بسیاری بوده است (Hsiao, 2000). افزایش غلظت دی اکسید کربن می‌تواند اثر ناشی از تنش خشکی را خنثی کند. بنابراین به‌کار بردن موادی که بتواند سبب افزایش غلظت دی‌اکسیدکربن در گیاه شود موجب بهبود عملکرد در شرایط خشکی می‌شود (Zebic *et al*., 2003). یکی از راهکارهای افزایش غلظت دی اکسید کربن در گیاهان استفاده از ترکیباتی نظیر متانول، اتانول، پروپانول، بوتانول و همچنین استفاده از اسیدهای آمینه گلیسین، گلوتامات و آسپارتات می‌باشد (Nonomura *et al*., 1997). در بین این ترکیبات متانول ماده کاملاً شناخته شده برای گیاهان می‌باشند زیرا این ماده یکی از ساده‌ترین فرآورده‌های گیاهی بوده که توسط گیاهان خصوصاً طی رشد برگ‌ها و در اثر دمتیلاسیون پکتین در دیواره‌های سلولی آن‌ها تولید می‌شود (Haston and Roj, 2001). پس از تولید این ماده آلی فرار در داخل گیاهان، مقداری از آن از برگ‌ها خارج و وارد لایه مرزی و سپس اتمسفر می‌شود (Mudgett and clarke, 1993) و بخش دیگر آن تبدیل به فرم آلدهید و سپس به اسید فرمیک و در نهایت به CO_2 تبدیل می‌شود. این CO_2 تولید شده می‌تواند بر روی آسیمیلاسیون CO_2 در گیاهان اثر بگذارد (Galbal and kristian, 2002). کاربرد خارجی متانول به‌طور مستقیم با فرآیندهای متابولیکی رشد و نمو گیاه در ارتباط است و همچنین با فرآیندهای مرتبط با مکانیسم‌های دفاعی از قبیل فعال شدن ژن‌های درگیر در بیوسنتز اسید جاسمونیک نیز مرتبط است (Gout *et al*., 2000). از پاسخ‌های گیاهان به تنش خشکی تجمع اسمولیت‌ها است که منجر به سازگاری اسمزی گیاه می‌شود(Ashraf and Iram, 2005). تجمع پرولین یک نشانگر مهم مقاومت به تنش خشکی در باکتری‌ها، جلبک‌ها و گیاهان عالی به‌حساب می‌آید (Bates *et al*., 1973). بررسی‌های انجام شده در مناطق خشک پاکستان نشان داد، که محلول‌پاشی متانول ۳۰ درصد در گیاه پنبه موجب افزایش مقاومت به تنش خشکی و افزایش میزان پرولین در گیاه می‌شود (Makhduma *et al*., 2002). در آزمایش دیگری محلول‌پاشی متانول باعث افزایش میزان کلروفیل، کارتنوئید و پرولین در برگ گندم، یولاف و مو در شرایط تنش خشکی شد (Ramandant and Omran, 2005). تنش خشکی سبب تولید گونه‌های اکسیژن فعال در گیاهان شده و عدم حضور مکانیسم محافظتی جهت حذف آن‌ها، سبب تخریب لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک می‌گردد (Ahmed *et al*., 2002). در گیاهان، سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی وجود دارد که سبب محافظت از لیپیدها، پروتئین‌ها و نوکلئیک اسیدها در مقابل اثرات تخریبی گونه‌های اکسیژن فعال می‌گردد (Sairam *et al*., 1997). در مطالعه بر روی گیاهان گندم و یولاف افزایش فعالیت بعضی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل کاتالاز و پراکسیداز در اثر محلول‌پاشی متانول مشاهده شد (Ramandant and Omran, 2005). با توجه به موارد اشاره شده از آنجا که نخود یک محصول با ارزش اقتصادی است و در رژیم غذایی جامعه نقش مهمی را ایفا می‌نماید و نظر به این که این گیاه حساس به خشکی است، لذا تحقیق حاضر با هدف بررسی تأثیر متانول بر ویژگی‌های بیوشیمیایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان از قبیل محتوای پروتئین برگی، پرولین، کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز به‌منظور بهبود شرایط تنش خشکی در گیاه نخود انجام شد.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثر تنش خشکی و محلول‌پاشی متانول بر روی خصوصیات بیوشیمیایی نخود (رقم کرج) آزمایشی

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

در شهریور ۱۳۹۰ در پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد اجرا گردید. آزمایش به‌صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای مورد بررسی در آزمایش محلول‌پاشی متانول در ۵ سطح شامل؛ شاهد (بدون محلول‌پاشی)، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درصد حجمی متانول که به هرکدام از محلول‌ها دو گرم در لیتر گلیسین اضافه شد. افزودن گلیسین به محلول آبی متانول سبب جلوگیری از صدمات ناشی از سمیت متانول می‌شود. عامل خشکی شامل شاهد (۱۰۰ درصد ظرفیت زراعی) و تنش خشکی (۲۵ درصد ظرفیت زراعی) در نظر گرفته شد.هر واحد آزمایشی در این آزمایش از یک گلدان به حجم ۲/۵ لیتر تشکیل شد که از ماسه و خاک مزرعه به نسبت ۳:۱ پر گردید. برای تهیه خاک هر گلدان، خاک تهیه شده ابتدا از الک دو میلی‌متر عبور داده شد و به‌میزان ۲ کیلوگرم در هر گلدان ریخته شد. درصد رطوبت خاک از طریق اندازه‌گیری درصد وزنی روزانه رطوبت خاک و اضافه نمودن آب مصرفی توسط هر گلدان، تنظیم شد.محلول‌پاشی ۳ بار طی فصل رشد گیاه صورت گرفت. اولین محلول‌پاشی طی مرحله رویشی در ۲۱ شهریور ماه به فاصله ٤ هفته پس از کاشت و محلول‌پاشی‌های دیگر به‌ترتیب در اوایل گلدهی و اوایل غلاف دهی انجام شد. نحوه محلول‌پاشی به این صورت انجام گرفت که بر روی تمام قسمت‌های بوته نخود قطرات محلول جاری شد.برای استخراج و سنجش پرولین و پروتئین به‌ترتیب از روش Bates و همکاران (1973) و Lowry (1951) استفاده شد.

به‌منظور سنجش کربوهیدرات محلول برگی، ۰/۱ گرم از بافت خشک برگ را به فالکون‌های پلاستیکی در پیچ‌دار منتقل کرده و سپس به آن ۱۵ میلی‌لیتر الکل اتیلیک ۸۰٪ که قبلاً آن را گرم نموده‌ایم افزوده و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس به‌منظور جدا کردن فاز جامد از مایع، فالکون‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. ۲ میلی‌لیتر از عصاره رویی به شیشه درپوش دار منتقل شد و ۱ میلی‌لیتر محلول فنل ۵٪ افزوده شد و به‌شدت تکان داده شد. سپس در زیر هود و به‌سرعت، ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۹۸٪ به هر شیشه اضافه شد. پس از گذشت ٤۵ دقیقه و با تثبیت رنگ قهوه‌ای مایل به زرد میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ٤۸۵ نانومتر قرائت شد. در نهایت میزان کربوهیدرات‌های محلول برگی با استفاده از منحنی استاندارد کربوهیدرات در واحد وزن خشک گیاه محاسبه گردید (Renaut *et al*., 2005).

سنجش پراکسید هیدروژن با استفاده از روش Sagisaka (1976) انجام شد. به این منظور مقدار ۰/۵ گرم از بافت تر برگ با ۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۱ درصد در حمام یخ کاملاً ساییده و همگن شد. هموژن حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. در مرحله بعد، در حمام یخ ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول فوق به لوله آزمایش منتقل و به آن ۰/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۱۰ میلی‌مولار با pH=۷ و ۱ میلی‌لیتر یدید پتاسیم ۱ مولار اضافه گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۳۹۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر تعیین گردید. سپس بر اساس منحنی استاندارد آب اکسیژنه، غلظت پراکسید هیدروژن در نمونه‌ها بر حسب میکرومول برگرم وزن تر برگ محاسبه شد. سنجش میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء با استفاده از روش Heath and Packer (1968) بر اساس تشکیل کمپلکس مالون دی آلدئید حاصل از پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء انجام شد. به این منظور ۰/۲ گرم بافت تر برگ با ۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی به‌خوبی ساییده و همگن شد. همگنای حاصل به‌مدت ۵ دقیقه و در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید. سپس ٤ میلی‌لیتر از محلول اسید تری کلرواستیک ۲۰ درصد که حاوی اسید تیوباربیتوریک ۰/۵ درصد بود، اضافه شد. مخلوط حاصله به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم ۹۰ درجه قرار گرفت و بعد از اتمام این مدت به حمام یخ منتقل شد. در مرحله بعد، مجدداً محلول مورد نظر به مدت ۱۰ دقیقه و در ۱۰۰۰۰ دور

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

سانتریفیوژ شد. در نهایت جذب نوری هر یک از نمونه‌ها در طول‌موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد و با استفاده از رابطه‌ی زیر غلظت مالون دی آلدئید محاسبه شد.

$$A=\varepsilon bc$$

در معادله‌ی فوق A: جذب نمونه مورد نظر، ε: ضریب خاموشی که برابر $1.55\times10^{-5}\,Mcm^{-1}$ است و c: غلظت مالون دی آلدئید بر حسب $\mu mol/gFW$ می‌باشد.

به‌منظور تهیه عصاره آنزیمی برگ ۰/۵ گرم برگ با ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم در هاون چینی ساییده شد. سپس مخلوط حاصل به لوله‌های آزمایش منتقل شد و با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ٢٤ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از پایان سانتریفیوژ، محلول رویی به‌عنوان عصاره آنزیمی استفاده شد. اندازه‌گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس روش Holy (1972) اندازه‌گیری شد. بدین منظور، ابتدا ۲ میلی‌لیتر تامپون استات ۰/۲ مولار با pH=۵، ۰/۲ میلی‌لیتر آب‌اکسیژنه ۰/۳ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر بنزیدین ۰/۰۲ مولار محلول در متانول ۵۰ درصد، در حمام یخ مخلوط شدند، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از عصاره آنزیمی برگ به این مخلوط واکنش اضافه شد. منحنی جذب نوری نمونه‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر هر ۳۰ ثانیه به مدت ۳ دقیقه در طول‌موج ۵۳۰ نانومتر رسم شد. واحد آنزیم به ازای $\mu mol\ ml^{-1}\ H_2O_2$ تجزیه شده در هر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تعریف شد و با کمک منحنی استاندارد فعالیت ویژه آنزیم بر حسب تغییرات واحد آنزیم در دقیقه به ازاء هر میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Candlee and Scandalios (1984) انجام شد. ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۵ مولار و ۰/۳ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳٪ در حمام یخ با یکدیگر مخلوط شدند و بلافاصله ۰/۲ میلی‌لیتر عصاره آنزیمی به آن افزوده شد. منحنی تغییرات جذب در طول‌موج ۲٤۰ نانومتر به مدت ۳-٤ دقیقه بررسی شد. فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات واحد در دقیقه به ازای میلی‌گرم پروتئین محاسبه شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز با روش بیوچمپ و فری دوویچ (Beauchampand Fridovich, 1971) انجام شد. بدین منظور ابتدا محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار تهیه شد و سپس ترکیبات زیر EDTA ۰/۱ میلی مولار، نیتروبلوتترازولیوم (NBT) ۷۵ میکرو مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار، ریبوفلاوین ٤ میکرومولار، به‌ترتیب اضافه گردید. در نهایت با اضافه شدن ۱۰۰ میکرولیتر عصاره تحت روشنایی لامپ فلورسنت واکنش آغاز می‌شود. پس از گذشت ۱۵ دقیقه جذب نمونه‌ها در طول‌موج ٥٦۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. یک واحد فعالیت سوپر اکسید دیسموتاز معادل ۵۰ درصد ممانعت از تغییر رنگ NBT در برابر نور بیان می‌شود. فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در مقدار پروتئین کل (میلی‌گرم) در ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بیان گردید. داده‌ها پس از جمع‌آوری توسط نرم‌افزار Mstat-C تجزیه واریانس شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

نتایج

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول‌پاشی متانول و تیمار تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر مقدار پروتئین کل محلول برگی داشت ($P \leq 0.01$)؛ اما اثر متقابل متانول و تنش بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۱). در بین تیمارهای محلول‌پاشی متانول بیشترین مقدار پروتئین کل در تیمارهای ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی متانول بود که با دیگر غلظت‌های متانول اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین مقدار برای این صفت نیز مربوط به سطح شاهد بود که با سطوح ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۲). تجزیه واریانس نتایج مربوط به تغییرات پرولین نشان داد که محلول‌پاشی متانول، تنش خشکی و اثر متقابل متانول و تنش بر میزان پرولین معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بود (جدول ۱).

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

در بین سطوح مختلف متانول، محلول‌پاشی ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی متانول بیشترین میزان پرولین را داشتند که با سایر سطوح حجمی متانول اختلاف معنی‌داری داشتند. کمترین میزان پرولین به سطح شاهد مربوط بود که با سطوح ۳۵ درصد حجمی متانول اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲). در برهم‌کنش متانول و تنش خشکی بیشترین میزان پرولین متعلق به سطح ۳۰ درصد حجمی متانول در تیمار تنش خشکی بود که با دیگر سطوح اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین میزان این صفت مربوط به سطح شاهد در تیمار بدون تنش خشکی بود (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول‌پاشی متانول و تیمار تنش خشکی تأثیر معنی‌داری ($P\leq 0.01$) بر میزان مالون دی آلدهید داشت؛ اما اثر متقابل متانول و تنش بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۱). در بین سطوح مختلف متانول، سطح شاهد بیشترین تجمع مالون دی آلدهید را داشت که با کلیه سطوح محلول‌پاشی متانول اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین تجمع نیز در سطح ۳۰ درصد حجمی متانول بود که با سطوح ۲۵ و ۳۵ درصد حجمی اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول‌پاشی متانول و تیمار تنش خشکی تأثیر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بر میزان پراکسید هیدروژن داشت. اثر متقابل متانول و تنش در تمامی سطوح نسبت به سطح شاهد کاهش داشت اما معنی‌دار نبود (جدول ۱). در بین غلظت‌های متانول مورد استفاده در آزمایش، سطح شاهد (بدون محلول‌پاشی) بیشترین میزان پراکسید هیدروژن را داشت که با سطوح ۳۵ و ۲۰ درصد حجمی متانول اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین میزان این صفت در سطح ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی متانول مشاهده شد که با سطوح شاهد و ۳۵ درصد حجمی تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول‌پاشی متانول و تیمار تنش خشکی تأثیر معنی‌داری ($P\leq 0.01$) بر میزان کربوهیدرات‌های محلول برگی داشت؛ اما اثر متقابل متانول و تنش بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۱). در بین تیمارهای محلول‌پاشی، غلظت‌های مختلف متانول اختلاف معنی‌داری باهم نداشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند ولی تفاوت آن‌ها با شاهد معنی‌دار بود (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول‌پاشی متانول ($P \leq 0.05$) و تیمار تنش خشکی ($P \leq 0.01$) تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز داشت. اثرات متقابل تنش خشکی و محلول‌پاشی متانول بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۱). در بین تیمارهای محلول‌پاشی غلظت ۳۵ درصد حجمی متانول بیشترین میزان فعالیت را داشت که با دیگر سطوح به‌جز سطح ۲۵ درصد حجمی تفاوت معنی‌داری نداشت و کمترین میزان فعالیت این آنزیم در سطح ۲۵درصد حجمی متانول مشاهده شد که با سطوح شاهد و ۳۵ درصد حجمی اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول‌پاشی متانول و تیمار تنش خشکی تأثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز داشت ($P \leq 0.01$). اما اثر متقابل متانول و تنش بر این صفت معنی‌دار نبود (جدول ۱). در بین سطوح مختلف متانول، بیشترین فعالیت آنزیم متعلق به سطح شاهد بود که با سطوح ۲۰ و ۳۵ درصد حجمی متانول اختلاف معنی‌داری نداشت. کمترین میزان این صفت در سطح ۳۰ درصد حجمی مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سطح شاهد و ۳۵ درصد حجمی متانول داشت (جدول ۲). نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تیمار محلول‌پاشی متانول و تیمار تنش خشکی تأثیر معنی‌داری ($P \leq 0.01$) بر میزان فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز داشت. اما اثر متقابل متانول و تنش بر فعالیت آن معنی‌دار نبود (جدول ۱). در بین تیمارهای محلول‌پاشی متانول، سطح شاهد بیشترین فعالیت را داشت که با سطوح ۲۰ و ۳۵ درصد حجمی متانول تفاوت معنی‌داری نداشت. کمترین میزان فعالیت نیز در سطح ۳۰ درصد حجمی مشاهده شد که با کلیه سطوح جز سطح ۲۵ درصد حجمی اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۲).

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه نخود در سطوح مختلف محلول‌پاشی متانول تحت تنش شرایط خشکی

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات							
		پروتئین محلول برگی	پرولین	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	میزان کربوهیدرات	کاتالاز	پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز
متانول	4	0.379**	3.237**	0.071**	0.283**	39.449**	0.013*	0.043**	11.831**
تنش خشکی	1	1.432**	35.035**	0.717**	5.559**	748.701**	0.117**	0.087**	22.136**
متانول×تنش	4	0.068^{ns}	1.327**	0.006^{ns}	0.006^{ns}	5.519^{ns}	0.001^{ns}	0.005^{ns}	2.204^{ns}
خطای آزمایش	20	0.067	0.030	0.002	0.017	2.965	0.003	0.003	1.063
ضریب تغییرات (٪)	-	12.20	6.45	1.43	7.31	5.12	24.68	15.92	11.75

^{ns}، ** و *: به‌ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد

جدول ۲- مقایسه میانگین ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه نخود تحت تأثیر سطوح مختلف محلول‌پاشی متانول

متانول	پروتئین محلول برگی	پرولین	مالون دی آلدئید	پراکسید هیدروژن	میزان کربوهیدرات	کاتالاز	پراکسیداز	سوپراکسید دیسموتاز
شاهد	1.766 b	1.833 c	1.705 a	2.042 a	30.62 b	0.249 a	0.481 a	10.48 a
٪۲۰ حجمی	2.084 ab	2.917 b	1.333 b	1.828 ab	35.68 a	0.202 ab	0.365 abc	9.345 ab
٪۲۵ حجمی	2.382 a	3.208 a	1.145 bc	1.603 b	35.73 a	0.166 b	0.306 bc	7.790 bc
٪۳۰ حجمی	2.342 a	3.487 a	0.921 c	1.532 b	35.35 a	0.206 ab	0.265 c	6.933 c
٪۳۵ حجمی	2.028 ab	2.005 c	1.103 bc	1.843 ab	33.47 ab	0.269 a	0.408 ab	9.322 ab

میانگین‌هایی که در هر ستون حداقل دارای یک حرف مشترک می‌باشند مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن ($p \leq 0.05$) اختلاف معنی‌داری ندارند.

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

بحث

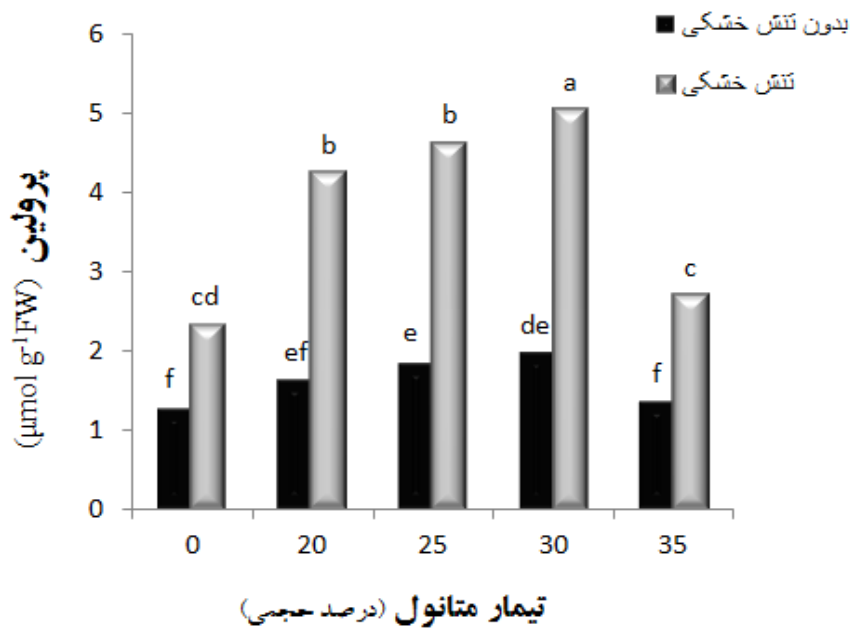
پروتئین کل محلول برگی

در تنش‌های غیرزنده از قبیل تنش خشکی، شوری، گرما و سرما، بیان یکسری از پروتئین‌ها در گیاه افزایش می‌یابد. این پروتئین‌ها در ایجاد سازگاری با شرایط تنش ایفای نقش می‌کنند. علاوه بر آن، در شرایط تنش شوری و خشکی در سازگاری اسمزی گیاه نیز نقش دارند (Ashraf and Harris, 2004). بالاتر بودن میزان پروتئین محلول برگی در رقم متحمل به تنش خشکی *P.aculeata* نسبت به رقم حساس به تنش *P.vulgaris* در بررسی Ashraf and Iram (2005)، نیز گزارش شده است. دریک آزمایش، تنش کمبود آب غلظت پرولین و پروتئین‌های محلول را در برگ‌های نخود افزایش داد به‌طوری که غلظت پروتئین‌های محلول در برگ‌ها تا ٤٣ درصد در مقایسه با تیمارهای شاهد افزایش یافت (Najaphy, *et al*., 2010). تنظیم اسمزی شامل تجمع فعال املاح سلولی از جمله پروتئین‌های محلول و پرولین در درون گیاه در پاسخ به کاهش پتانسیل آب خاک و کاهش اثرات مضر کمبود آب می‌باشد. به‌عنوان یک نتیجه تجمع املاح، پتانسیل اسمزی سلول را کاهش می‌دهد، که به‌نوبه خود، آب به درون سلول جذب شده و منجر به حفظ تورگر آن می‌شود (Najaphy, *et al*., 2010). افزایش در غلظت پروتئین محلول تحت تنش خشکی می‌تواند به افزایش در سنتز پروتئین مربوط باشد. پرولین آزاد، قند محلول و پروتئین‌های محلول به‌عنوان عوامل اسمزی یا محافظت کننده‌های اسمزی نقش مهمی در تنظیم اسمزی کمبود آب دارند. در این مطالعه نیز مقدار پروتئین کل محلول برگی در شرایط تنش افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت. باکتری‌های همزیست مانند متیلوتروفیک روی برگ اکثر گیاهان زراعی زندگی می‌کنند که این باکتری‌ها در ازای دریافت متانول که از برگ گیاه خارج می‌شود پیش‌ماده ساخت بعضی از هورمون‌ها مانند اکسین و سیتوکینین را که نقش مهمی در تسریع روند رشد و فرآیندهای فیزیولوژیکی گیاه به عهده دارند را در اختیار گیاه قرار می‌دهد (Ivanova *et al*., 2001). به‌نظر می‌رسد محلول‌پاشی متانول با افزایش فعالیت باکتری‌های متیلوتروفیک منجر به افزایش تولید هورمون اکسین و سیتوکینین در گیاه می‌شود و از طرف دیگر مشخص شده هورمون‌های اکسین و سیتوکینین در افزایش پروتئین‌سازی در گیاهان نقش بسزایی دارند (Ivanova *et al*., 2001). در آزمایشی بر روی بادام‌زمینی گزارش شد که محلول‌پاشی متانول منجر به افزایش مقدار پروتئین در گیاه شد (Vyshkayy *et al*., 2008).

پرولین

افزایش پرولین در شرایط تنش خشکی، به‌عنوان یک پاسخ دفاعی گیاه به تنش خشکی مطرح است. تجمع زیاد پرولین در سلول‌های تحت تنش سبب محافظت از سلول در شرایط تنش و همچنین جلوگیری از ایجاد سمیت در سلول می‌شود (Tawfik, 2008). پرولین همچنین در حفظ ساختار غشاء، ایجاد سازگاری اسمزی و حفظ ساختار آنزیم‌ها در سلول، ایفای نقش می‌کند (Ashraf and Iram, 2005). به‌دلیل خاصیت هیدروفیلی پرولین، این مولکول ممکن است جایگزین مولکول‌های آب در اطراف نوکلئیک اسیدها، پروتئین‌ها و مولکول‌های غشایی گردد و از این طریق اثرات یون‌های تخریب‌کننده برای ترکیبات را کاهش داده و بدین‌وسیله محافظت از این ترکیبات و ساختار غشاء را انجام دهد (Bayoumi *et al*., 2008). در بررسی که بر روی *Lotus japonicus* صورت گرفت افزایش میزان پرولین در شرایط تنش خشکی و شوری را تأیید نمودند (Diaz *et al*., 2005). در این تحقیق دلیل افزایش پرولین در شرایط تنش را به‌علت افزایش فعالیت آنزیم پیرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز (که در مسیر بیوسنتز پرولین نقش دارد) و کاهش فعالیت آنزیم پرولین دهیدروژناز (که در تجزیه پرولین ایفای نقش می‌کند) دانسته‌اند. علاوه بر این، تبدیل پرولین به گلوتامات نیز به‌عنوان دلیلی دیگر برای کاهش میزان پرولین در سطوح پایین تنش شوری ذکر شده است (Diaz *et al*., 2005). نتایج تحقیقات Najaphy و همکاران (2010) نیز

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]



شکل ۱- اثر متقابل متانول و تنش خشکی بر محتوای پرولین

* ستون‌هایی که دارای حروف مشترک می‌باشند مطابق آزمون چنددامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری ندارند (در سطح احتمال ۵ درصد).

موید افزایش میزان پرولین در ژنوتیپ‌های نخود تحت شرایط تنش خشکی است. در این تحقیق نیز تیمار تنش خشکی باعث افزایش میزان پرولین نسبت به تیمار بدون تنش خشکی شد. متانول محلول‌پاشی شده بر روی برگ توسط آنزیم متانول اکسیداز و با از دست دادن $2H^+$ تبدیل به فرمات (متانوئیک اسید) می‌شود. فرمات در مرحله بعد توسط آنزیم فرمات دهیدروژناز تبدیل به CO_2 و H^+ می‌شود (Nonomura *et al.*, 1992). از طرف دیگر گزارش شده آنزیم پیرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز (P5CS) در شرایط اسیدی بیشترین فعالیت را دارد (Yordanov *et al.*, 2003). به‌نظر می‌رسد متانول با کاهش pH در گیاه منجر به افزایش فعالیت آنزیم پیرولین ۵-کربوکسیلات سنتتاز شده و در نهایت تجمع پرولین در برگ را خواهیم داشت. پرولین علاوه بر شرکت در تنظیم اسمزی، نقش‌های مهمی مانند حفاظت از سیستم‌های غشایی سلول (Terzi *et al.*, 2006)، سمیت زدایی (Puritch and Barker, 1967) و تنظیم اسیدیته سیتوزول را نیز بر عهده دارد (Hare *et al.*, 1998).

مالون دی آلدئید

جمع مالون دی آلدئید در شرایط تنش خشکی نشان دهنده تخریب غشاءهای سلولی است (Eraslan *et al.*, 2007). تولید گونه‌های اکسیژن فعال طی تنش اکسیداتیو ناشی از تنش خشکی، سبب تخریب ساختار لیپیدی غشاء شده و از این طریق میزان مالون دی آلدئید را افزایش می‌دهد (Eraslan *et al.*, 2007). در این مطالعه نیز تجمع مالون دی آلدئید در شرایط تنش خشکی افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت. نتایج حاصل از بررسی محققان نشان داده است که در شرایط تنش خشکی، میزان پراکسیداسیون لیپیدها افزایش یافته و در نتیجه میزان مالون دی آلدئید در سلول‌های تحت تنش افزایش می‌یابد (Gunes *et al.*, 2006). با توجه به کاهش میزان پراکسید هیدروژن و پراکسیداسیون لیپیدها در اثر محلول‌پاشی متانول در این مطالعه می‌توان کاهش تجمع مالون دی آلدهید را منطقی دانست.

پراکسید هیدروژن

تنش‌های محیطی از جمله تنش شوری، خشکی و دمای بالا سبب محدود شدن تثبیت دی اکسید کربن می‌شوند، بنابراین می‌توان گفت که با کاهش غلظت دی اکسید کربن کلروپلاستی، تنفس نوری افزایش یافته و در نتیجه

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

تولید پراکسید هیدروژن نیز افزایش می‌یابد (Yoadanov *et al*., 2003). نتایج بررسی محققان نشان داده است که پراکسید هیدروژن به‌عنوان یک سیگنال جهت بسته شدن روزنه‌ها، سازگاری برگ نسبت به‌میزان نور زیاد و همچنین القاء پروتئین‌های شوک گرمایی عمل می‌نماید (Mahajan and Tuteja, 2005). علاوه بر این، تجمع پراکسید هیدروژن سبب القاء تجمع هورمون‌های تنش از قبیل سالیسیلیک اسید و اتیلن نیز می‌شود (Shao *et al*., 2008). Nayyar and Gupta (2006) نیز افزایش میزان پراکسید هیدروژن در گیاهان گندم (*Triticum aestivum*) و ذرت (*Zea mays*) را در شرایط تنش خشکی گزارش نمودند. در این مطالعه نیز میزان پراکسید هیدروژن در شرایط تنش خشکی افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت. برای جلوگیری از کاهش چرخه انتقال الکترون کلروپلاستی، گیاهان عالی مسیر تنفس نوری را به راه انداخته و از این طریق سبب تولید مجدد $NADP^+$ می‌شوند. در قسمتی از مسیر تنفس نوری پراکسید هیدروژن در پراکسیزوم‌ها تولید می‌شود که می‌تواند ناشی از پراکسیداسیون اسیدهای چرب در پراکسیزوم باشد (Shao *et al*., 2008). محلول‌پاشی متانول سبب افزایش تثبیت دی اکسید کربن می‌شود، بنابراین تولید مجدد $NADP^+$ توسط سیکل کالوین افزایش یافته و به‌دنبال آن چرخه انتقال الکترون فتوسنتزی نیز افزایش می‌یابد که این امر منجر به کاهش تولید رادیکال‌های سوپراکسید و اکسیژن یکتایی در کلروپلاست‌ها می‌گردد.

کربوهیدرات محلول برگی

از میان مواد اسموتیک آلی موجود در گیاهان، قندها مسئول بیش از ۵۰٪ پتانسیل اسمزی ایجاد شده در گیاه در شرایط تنش شوری و خشکی می‌باشند (Mahajan and Tuteja, 2005). افزایش میزان کربوهیدرات‌ها در شرایط تنش می‌تواند به‌عنوان یک سیگنال متابولیکی به تنش خشکی و شوری عمل نماید و در بروز پاسخ‌های دفاعی نقش داشته باشد (Niknam *et al*., 2004). محلول‌پاشی متانول باعث افزایش غلظت CO_2 شده که می‌تواند میزان تثبیت CO_2 را در گیاه افزایش دهد (Zebic *et al*., 2003). متانول در مقایسه با CO_2 مولکول نسبتاً کوچک‌تری است که به‌راحتی توسط گیاهان، جذب شده و مورد استفاده قرار می‌گیرد (Downie *et al*., 2004). یکی از مهم‌ترین خصوصیات آنزیم روبیسکو این است که نه تنها ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات را کربوکسیله می‌کند بلکه آن را اکسید نیز می‌کند. اکسیداسیون نیز منجر به انجام تنفس نوری در گیاه می‌شود (Makhdum *et al*., 2002). متانول با متابولیزه شدن سریع به دی اکسید کربن (Gout *et al*., 2000) و با افزایش CO_2 منجر به روند کربوکسیلاسیون بیشتر و اکسیژناسیون کمتر در گیاه می‌شود (Faver and Greik, 1996). بنابراین با افزایش فتوسنتز در اثر کاربرد متانول، افزایش کربوهیدرات محلول برگی را خواهیم داشت. در بررسی که بر روی پنبه در مناطق خشک پاکستان صورت گرفت، بیشترین میزان آسیمیلاسیون CO_2 و فتوسنتز در غلظت ۳۰ درصد حجمی متانول مشاهده شد (Makhdum *et al*., 2002).

کاتالاز

کاتالاز به‌عنوان یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی عمل کرده و در حذف و جاروب کردن پراکسید هیدروژن تولید شده در پراکسیزوم‌ها و کاهش اثرات تخریبی گونه‌های اکسیژن فعال نقش مهمی بر عهده دارد (Simova Stoilova *et al*., 2008). در مطالعه‌ای که بر روی ذرت انجام گرفت گزارش کردند که افزایش فعالیت کاتالاز، سبب افزایش پتانسیل دفاعی گیاه در مقابل تنش خشکی شده و میزان تحمل این گیاه به شرایط تنش خشکی را بهبود می‌بخشد (Helal and samir, 2008). افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز در گیاه لوبیا تحت تنش خشکی نیز گزارش شده است (Ahmed *et al*., 2002). در این مطالعه نیز فعالیت آنزیم کاتالاز در شرایط تنش خشکی افزایش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت. یکی از نقش‌های مهم محلول‌پاشی متانول جلوگیری از کاهش اثر تنش‌های القا شده به گیاهان زراعی در اثر انجام تنفس نوری در آن‌هاست (Downie *et al*., 2004). با توجه به اینکه ۲۵٪

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

از کربن گیاه صرف تنفس نوری می‌شود با استفاده از محلول‌پاشی متانول که منجر به افزایش غلظت CO_2 درون‌سلولی می‌شود می‌توان مقدار تنفس نوری را به کمترین اندازه رساند (Ramberg *et al*., 2002). از این رو با کاهش تنفس نوری پراکسید هیدروژن تولید شده در پراکسیزوم کاهش می‌یابد (Simova Stoilova *et al*., 2008). از طرف دیگر نقش اصلی کاتالاز جاروب کردن پراکسید هیدروژن تولید شده از تنفس نوری می‌باشد (Simova Stoilova *et al*., 2008). بنابراین به‌نظر می‌رسد متانول با کاهش میزان پراکسید هیدروژن در کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز نقش دارد.

پراکسیداز

پراکسیداز اغلب به‌عنوان آنزیم آنتی‌اکسیدان در نظر گرفته شده، که از سلول در برابر نفوذ مخرب H_2O_2 و گونه‌های اکسیژن فعال محافظت می‌کند. افزایش فعالیت پراکسیداز تحت تنش آب نشان دهنده شکل‌گیری بخش زیادی H_2O_2 در طول تنش آبی است (Helal and samir, 2008). پراکسید هیدروژن و سوپراکسید هیدروژن اولین ترکیب‌های تولید شده در شرایط تنش خشکی هستند، لذا پراکسیداز و سوپراکسید دیسموتاز احتمالاً اولین آنزیم‌های مقابله با آن‌ها می‌باشند (Gunes *et al*., 2006). به‌نظر می‌رسد پراکسیدازها عموماً به‌عنوان آنزیم‌های مسمومیت‌زدای گونه‌های اکسیژن فعال عمل می‌کنند، زیرا پراکسید هیدروژن (H_2O_2) ماده‌ای است که برای دامنه گسترده‌ای از واکنش‌های وابسته به پراکسیداز به‌عنوان ماده پذیرنده عمل می‌کند (Dat *et al*., 2000). افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز در شرایط تنش خشکی در گیاه *Ctenanthe Setosa* و در شرایط تنش شوری در گیاه ذرت نیز گزارش شده است (Levent tona *et al*., 2008). آنزیم روبیسکو با اکسیده کردن ریبولوز ۱ و ۵ بیس فسفات منجر به انجام تنفس نوری در گیاه می‌شود (Makhdum *et al*., 2002). متانول با متابولیزه شدن سریع به دی اکسید کربن (Gout *et al*., 2000) و با افزایش CO_2 منجر به روند کربوکسیلاسیون بیشتر و اکسیژناسیون کمتر در گیاه می‌شود (Faver and Greik, 1996). کاهش تنفس نوری در اثر کاربرد متانول در سویا و کلروپلاست‌های اسفناج نیز گزارش شد (Gout *et al*., 2000). بنابراین کاهش فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز را می‌توان به کاهش تنش‌های القا شده در طی فرآیند تنفس نوری از قبیل کاهش میزان پراکسید هیدروژن و سوپراکسید هیدروژن در برگ‌ها نسبت داد.

سوپر اکسید دیسموتاز

در تحقیقی روی گیاهان یولاف مشاهده کردند که در شرایط تنش خشکی کاهش شدیدی در فعالیت آنزیم سوپراکسیددیسموتاز در مرحله گلدهی رخ داد. این کاهش فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز از یک گونه به گونه دیگر متغیر بود (Helal and samir, 2008). این محققان کاهش در فعالیت سوپراکسیددیسموتاز را تحت تنش خشکی نشان دهنده مهار توانایی پالایش کنندگی در سلول‌های برگ بیان کردند و نیز اظهار داشتند هرگونه کاهش در فعالیت SOD را می‌توان به کاهش سنتز یا افزایش تخریب آنزیم نسبت داد (Gunes *et al*., 2006). همچنین در یک تحقیق دیگر روی گیاهان ذرت مشاهده شد که در بعضی مراحل رشد و نمو گیاهان ذرت، تنش خشکی باعث کاهش فعالیت سوپراکسیددیسموتاز شد، درحالی‌که در همین مراحل فعالیت پراکسیداز در اثر تنش خشکی افزایش یافت (Koca *et al*., 2007). در این مطالعه نیز فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در شرایط تنش خشکی کاهش معنی‌داری نسبت به شرایط بدون تنش داشت. سوپراکسید دیسموتاز اولین مرحله دفاعی علیه ROSها را تشکیل می‌دهد و یکی از مهم‌ترین پالایش کننده‌های سوپراکسید است. در نتیجه فعالیت این آنزیم سوپراکسید به پراکسید هیدروژن و اکسیژن تبدیل می‌شود. سپس پراکسید هیدروژن تولید شده به‌وسیله پراکسیدازها پالایش می‌گردد (Eraslan *et al*., 2007). یک حالت از تشکیل ROS بسته شدن روزنه به‌عنوان یک پاسخ به خشکی و در نتیجه کاهش غلظت CO_2 در مزوفیل برگ و در نتیجه تجمع NADPH است، در این حالت اکسیژن

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

به‌عنوان یک پذیرنده جایگزین الکترون‌ها عمل می‌کند که منجر به تشکیل رادیکال‌های سوپراکسید می‌شود (Yordanov *et al*., 2003). به‌نظر می‌رسد متانول با تبدیل به CO_2 سبب افزایش غلظت CO_2 درون سلول‌های برگی شده و با انجام عمل فتوسنتز و ماده سازی بیشتر منجر به مصرف NADPH تولید شده در زنجیره انتقال الکترون می‌شود، بدین منظور از تجمع آن در کلروپلاست سلول‌های برگی و تشکیل سوپراکسید جلوگیری می‌شود. از طرف دیگر کاهش میزان پراکسید هیدروژن در سطوح ۲۵ و ۳۰ درصد حجمی متانول نشان دهنده فعالیت کمتر آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در این سطوح است.

References

Ahmed, S., Nawata, E., Hosokawa, M., Domae, Y. and Sakuratani, T. (2002). Alterations in photosynthesis and some antioxidant enzymatic activity of mungbean subjected to waterlogging. Journal of Plant Science 163: 117-123.

Ashraf, M and Iram, A. (2005). Drought stress induced changes in some organic substances in nodules and other plant parts of two potential legumes differing in salt tolerance. Journal of Flora 200: 535-546.

Ashraf, M. and Harris, P.J.C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants, Journal of Plant Science 166: 3-16.

Bates, L.S., Waldern, R.P. and Teare, I.D. (1973). Rapid determination of free proline for water stress studies. Plant Soil Environment 39: 205–207.

Bayoumi, T.Y., Eid, M. and Metwali, E.M. (2008). Application of physiological and biochemical indices as a screening technique for drought tolerance in wheat genotypes. African Journal of Biotechnology 7: 2341-2352.

Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acryl amide gels. Annual Reviw Biochemistry 44: 276-287.

Chandlee, J.M. and Scandalios, J.G. (1984). Analysis of variants affecting the catalase development program in Maize scutellum. Journal of Apply Genetic 69: 71–77.

Clover, G., Smith, H., and Jaggard, K. (1998). The crop under stress. British Sugar Beet Review 66(3): 17-19.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D and Van Breusegem, F. (2000). Dual action of active oxygen species during plant stress responses. Cellular and Molecular Life Science 57: 779-795.

Diaz, P., Monza, J. and Marquez, A. (2005). Drought and saline stress, *Lotus japonicas*. Haworth Press, Inc., San Diego.

Downie, A., Miyazaki, S., Bohnert, H., John, P., Coleman, J., Parry, M and Haslam, R. (2004). Expression profiling of the response of Arabidopsis thaliana to methanol stimulation. Photochemistry 65: 2305-2316.

Eraslan, F., Inal, A., Savasturk, O. and Gunes, A. (2007). Changes in antioxidative system and membrane damage of lettuce in response to salinity and boron toxicity. Journal of Crop and Horticultural Science 114: 5-10.

Faver, K.L. and Gerik, T.J. (1996). Foliar-applied methanol effects on cotton (*Gossypium hirsutum*.L) gas exchange and growth. Field Crops Research 47: 227-234.

Galball, E and Kristine, W. (2002). The production of methanol by flowering plants and the global cycle of methanol. Journal of Atmospheric Chemistry 43: 195-229.

Gout, E., Aubert, S., Bligny, R., Rebeille, F., Nonomura, A.R., Benson, A. and Douce, R. (2000). Plant Metabolism of methanol in plant cells. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies. Journal of Plant Physiology 123: 287-296.

Gunes, A., Cicek, N., Inal, A., Alpaslan, M., Eraslan, F., Guneri E. and Guzelordu, T. (2006). Genotypic response of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars to drought stress implemented at pre-and post anthesis stages and its relations with nutrient uptake and efficiency. Journal of Plant Soil Environment 52: 868-876.

Hare, P. D., Cress W. A. and Van Standen J. (1998). Dissecting the rols of osmolyte accumulation during stress. Plant Cell Environment 21: 535–553.

Haston, A.D., and Roje, S. (2001). One carbon metabolism in higher plants. Annual Reviw of Plant Biology 52: 119-138.

Heath, R.L. and Packer, L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Journal of Biochemistry and Biophysics 125: 189–198.

Helal, R.M. and Samir, M. A. (2008). Comprative response of drought tolorant and drought sensitive maize genotypes to water stress. Australian Journal crops science 1: 31-36.

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

Holy, M. C. (1972). Indole acetic acid oxidase: a dual catalytic enzyme. Journal of Plant Physiology. 50: 15-18.

Hsiao, T.C. (2000). Leaf and root growth in relation to water status. Journal of Horticultural Science 35: 1051-1058.

Ivanova, E. G., Dornina, N. V., Shepelyakovskaya, A. O., Laman, A. G., Brovko, F. A. and Trotsenko Y. A. (2001). Faculative and obligate aerobic methylobacteria synthesize cytokinins. Journal of Microbiology 69: 646-651.

Ivanova, E. G., Dornina, N. V and Trotsenko, Y. A. (2001). Aerobic methylobacteria are capable of synthesizing auxins. Journal of Microbiology 70: 392-397.

Koca, H., Bor, M., Ozdemir, F. and Turkan, I. (2007). The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. Environmental and Experimental Botany 60: 344-351.

Levent tona, A., Kaya, C., Dikilitas, M. and Higgs, D. (2008). The effects of gibberelic acid and salinity on some antioxidant enzyme activities, plant growth parameters and nutritional status in maize plants. Environmental and Experimental Botany 62: 1-9.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randapp, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Research Chemistry 191: 265-275.

Mahajan, S. and Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview, Journal of Biochemistry and Biophysics 444: 139–158.

Makhdum, I. M., Nawaz, A. Shabab, M., Ahmad, F., and Illahi, F. (2002). Physiological response of cotton to methanol foliar application. Journal of Research Pakistan Zakariya University 13: 37-43.

Mudgett, M. E. and Clarke, S. (1993). Characterization of plant L-isoaspartyl methyltransferases that may be involved in seed survival. Purification, characterization and sequence analysis of the wheat germ enzyme. Journal of Biochemistry Research 32: 1100-1111.

Najaphy, A., Niari khamssi, N., Mostafaie, A. and Mirzaee, H. (2010). Effect of progressive water deficit stress on praline accumulation and protein profiles of leaves in chickpea. African Journal of Biotechnology 9: 7033-7036.

Nayyar, H. and Gupta, D. (2006). Differential sensitivity of C_3 and C_4 plants to water deficit stress: Association with oxidative stress and antioxidants. Environmental Experience Botany 58: 106-113.

Niknam, V., Bagherzadeh, M., Ebrahimzadeh, H. and Sokhansanj, A. (2004). Effect of NaCl on biomass and contents of sugers, proline and proteins in seedlings and leaf explants of *Nicotiana tabacum* grown in vitro. Journal of Biological Plantarum 48: 613-615.

Nonomura, A. M. (1997). Method and composition for enhancing carbon fixation in plants. National Academy Science 99: 974-984.

Nonomura, A. M., and Benson, A. A. (1992). The path of carbon in photosynthesis: Improved crop yields with methanol. National Academy Science 89: 9794-9798.

Ober, E. (2001). The search for drought tolerance in sugar beet. British Sugar Beet Review. 69: 40-43.

Puritch, G. S. and A. V. Barker. (1967). Structure and function of tomato leaf chloroplasts during ammonium toxicity. Journal of Plant Physiology 42: 1229-1238.

Ramadant, T. and Omran, Y. (2005). The effects of foliar application of methanol on productivity and fruit quality of grapevine cv. flame seedlees. Vitis Journal 44, 11-16.

Ramberg, H. A., Bradley, J. S., Olson, J. N. Nishio, J. Markwell, A and Osterman J. C. (2002). The role of methanol in promoting plant growth. Review Plant Biochemistry and Biotechnology. 1:113-126.

Renaut, J., Hoffmann, l. and Hausman, J. F. (2005). Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing tolerance in poplar planted. Journal of Physiological Plantarum 125: 82-94.

Sagisaka, S. (1976). The occurrence of peroxide in a perennial plant Populas gelrica. Journal of Plant Physiology 57: 308–309.

Sairam, R. K., Deshmukh, P. S and Shukla, D. S. (1997). Tolerance of drought and temperature stress in relation to increased antioxidant enzyme activity in wheat. Journal of Agronomy and Crop Science 178: 171-176.

Shao, H. B., Chu, L. Y., Lu, Z. H and Kang, C. M. (2008). Primery antioxidant free radical scavenging and redox signalling pathways in higher plant cells. International Journal Biology Science 4: 8-14.

Simova-Stoilova, L., Demirevska, K., Petrova, T., Tsenov, N and Feller, U. (2008). Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. Plant Soil Environment 54: 529-536.

Tawfik, K. M. (2008). Effect of water stress in addition to potassiom application on mungbean. Australian Journal Basic Apply Science 2: 42-52.

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

Vyshkayy, M., Noormohammadi, Gh., Majidi, A., and Rabii, B. (2008). Effect of methanol on the growth function peanuts. Journal of Agricultural Sciences 1: 102-87. (In Persian).

Yordanov, I., Velikova, V. and Tsonev, T. (2003). Plant responses to drought and stress tolerance. Bulgharestan Journal of Plant Physiology 2: 187-206.

Zbiec, I., Karczmarczyk, S and Koszanski, Z. 2003. Influence of methanol on some cultivated plants. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities 6: 1-7.

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]

Effects of Foliar Application of Methanol on Biochemical Characteristics and Antioxidant Enzyme Activity of Chickpea *(Cicer arietinum* L.*)* Under Drought Stress

Saeed Reza Hossinzadeh [1], Azam Salimi [2], Ali Ganjeali [3] and Raheleh Ahmadpour [4,*]

1- Biology Department, Faculty of Science, Khatam Al-Anbia University of Tecnology, Behbahan, Iran
2- Biology Department, Faculty of Science, Karazmi University, Tehran, Iran
3- Biology Department, Faculty of Science, Ferdowsi University, Mashhad, Iran
4- Biology Department, Faculty of Science, Khatam Al-Anbia University of Tecnology, Behbahan, Iran

Abstract

In order to evaluate the effects of foliar application of methanol on some physiological characteristics of chickpea under drought stress, an experiment was conducted as a factorial based on completely randomized design with three replications in 2011 at the Research Center of Plant Sciences in Ferdowsi University of Mashhad. The first factor was different levels of methanol including, 0 (control), 20, 25, 30, 35 volumetric percentage (v/v), which were used as foliar applications at three times during growth season of chickpea, with 10 days intervals. Second factor was drought stress condition in two levels 25 and 100 percent of field capacity. Results showed that there was significant difference ($P \leq 0.01$) between methanol levels concentrations regarding to leaf protein content, proline content, total soluble sugar, H_2O_2 content, catalase, peroxidase and SOD enzyme activity. Spraying with 30% volume level significantly increasedleaf protein, proline and total soluble sugar content compared to control. Effects of drought and methanol were not significant on antioxidant enzyme activity, leaf protein content, total soluble sugar and H_2O_2 content but on the proline content was significant ($P \leq 0.05$).

Key word: Foliar application methanol, Drought stress, Antioxidant activity

* **Corresponding Author, E-mail: ahmadpour@bkatu.ac.ir**

[Downloaded from ijppb.lu.ac.ir on 2024-04-17]